

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



(19) Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Numéro de publication: 0 518 096 A1

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 92108573.4

(51) Int. Cl.⁵: A23C 9/123, C12N 1/20,
C12N 15/01

(22) Date de dépôt: 21.05.92

(30) Priorité: 14.06.91 EP 91109807

(43) Date de publication de la demande:
16.12.92 Bulletin 92/51

(84) Etats contractants désignés:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL PT
SE

(71) Demandeur: SOCIETE DES PRODUITS NESTLE
S.A.
Case postale 353
CH-1800 Vevey(CH)

(72) Inventeur: Hottinger, Herbert
Ch. de Mottex 2A
CH-1807 Blonay(CH)
Inventeur: Mignot, Olivier
ch. de Bahyse 5
CH-1807 Blonay(CH)
Inventeur: Mollet, Beat
Ch. des Marguerites 1
CH-1074 Molle-Margot(CH)

(54) Yogourt contenant des microorganismes vivants.

(57) Yogourt longue conservation comprenant de 10^6 - 10^{10} cellules/ml d'un mutant de *Lactobacillus bulgaricus* dans l'ADN duquel manque un fragment comprenant une partie au moins du gène bêta-galactosidase, et de 10^6 - 10^{10} cellules/ml de *Streptococcus thermophilus*.

EP 0 518 096 A1

La présente invention a pour objet un yogourt et son procédé de préparation, ainsi qu'un mutant de *Lactobacillus bulgaricus* et son procédé de sélection.

Le yogourt est obtenu par fermentation d'un lait avec une combinaison de souches de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus* et se présente sous forme de gel contenant les souches vivantes. C'est un produit frais, à conservation limitée, même sous réfrigération. Divers procédés ont été proposés pour améliorer ses propriétés de conservation, notamment pour réduire l'augmentation de son acidité, autrement dit sa postacidification, et l'apparition d'un goût amer qui dégradent ses qualités organoleptiques.

C'est ainsi que JP-A-85256341 propose la préparation d'un yogourt doux en utilisant un levain mixte dans lequel les nombres de cellules/ml de *L.bulgaricus* et *S.thermophilus* sont dans un rapport préféré de 1:100. Si la réduction du nombre relatif de cellules de *L.bulgaricus* peut permettre de réduire la postacidification du yogourt en cours de conservation sous réfrigération, elle peut cependant entraîner aussi une réduction du caractère organoleptique typiquement yogourt du produit qui est dû au travail en symbiose des deux microorganismes.

US 4425366 décrit la préparation d'un yogourt longue conservation à l'aide d'une combinaison de souches de *L.bulgaricus* et de *S.thermophilus* dans laquelle la souche de *L.bulgaricus* présente une faible activité protéolytique. Ce document propose cependant également d'utiliser un nombre relatif de cellules de *L.bulgaricus* de l'ordre de 1:100.

US 4734361 décrit la sélection d'une souche de *L.bulgaricus* sensible aux basses températures, autrement dit présentant une faible activité à une température de conservation de 10°C tout en présentant une bonne activité à une température de fermentation de 43°C. La souche FERM BP-1041 ainsi sélectionnée a été dérivée de la souche ATCC 11842.

JP-A-90053437 décrit la préparation d'un yogourt en utilisant, en combinaison avec une souche de *S.thermophilus*, une souche de *L.bulgaricus* sélectionnée pour son incapacité (mutant artificiel SBT-0218) ou sa capacité réduite (mutant naturel SBT-0220) à fermenter le lactose. Le lait de départ doit alors être supplémenté en glucose.

WO 90/05459 propose la construction d'un *L.bulgaricus* sensible aux basses températures ou aux bas pH par mutation sélective sur *E.coli* d'un gène bêta-galactosidase prélevé sur *L.bulgaricus* et destiné à être reincorporé à *L.bulgaricus*.

La présente invention a pour but de proposer la préparation d'un yogourt dont les qualités organoleptiques ne se dégradent pas à la conservation tout en présentant un caractère traditionnel typique dû au travail en symbiose des deux microorganismes *S.thermophilus* et *L.bulgaricus*. Elle a également pour but de proposer un procédé reproductible et sûr de sélection d'un mutant de *L.bulgaricus* qui, utilisé en combinaison avec au moins une souche de *S.thermophilus*, permette de préparer un tel yogourt.

A cet effet, le yogourt selon la présente invention comprend:

- 10-20% en poids de matière sèche d'un lait animal et/ou végétal,
- de 10^6 - 10^{10} cellules/ml d'un mutant de *Lactobacillus bulgaricus* dans l'ADN duquel manque un fragment comprenant une partie au moins du gène bêta-galactosidase, et
- de 10^6 - 10^{10} cellules/ml de *Streptococcus thermophilus*.

De même, dans le procédé de préparation d'un yogourt selon la présente invention, on fait fermenter un lait avec une combinaison d'au moins une souche de *Streptococcus thermophilus* et d'un mutant de *Lactobacillus bulgaricus* dans l'ADN duquel manque un fragment comprenant une partie au moins du gène bêta-galactosidase.

Le mutant de *Lactobacillus bulgaricus* selon la présente invention présente donc un ADN où manque un fragment comprenant une partie au moins du gène bêta-galactosidase.

Enfin, dans le procédé de sélection d'un mutant de *L.bulgaricus* selon la présente invention,

- on réalise un criblage d'une souche mère de *L.bulgaricus* sur plaque X-gal pour isoler des colonies présentant une mutation bêta-galactosidase moins,
- on soumet ces colonies de mutants à un test de stabilité dans un milieu contenant du lactose comme seule source d'énergie,
- on digère l'ADN chromosomal de mutants stables à l'aide d'enzymes de restriction et on le soumet à un test de détection de fragments compris dans une région comprenant le gène bêta-galactosidase, et
- l'on sélectionne un mutant présentant un ADN dans lequel manque un fragment comprenant une partie au moins du gène bêta-galactosidase.

On a constaté en effet qu'il est ainsi possible de proposer un yogourt dans lequel la postacidification et l'apparition d'un goût amer à la conservation soient notablement réduits et dont par ailleurs les qualités organoleptiques présentent un caractère traditionnel typique du yogourt dû au travail en symbiose des deux

microorganismes *S.thermophilus* et *L.bulgaricus*.

On a constaté notamment que le mutant de *L.bulgaricus* selon la présente invention présente la propriété surprenante de ne provoquer qu'une faible postacidification à la conservation tout en travaillant de manière active en symbiose avec *S.thermophilus* durant la fermentation, les nombres respectifs de cellules de ces deux microorganismes pouvant en particulier se trouver dans un rapport relativement équilibré, notamment un rapport de environ 1:20 - 1:1, aussi bien au départ de l'incubation que dans le yogourt obtenu.

Dans deux formes d'exécution préférées du yogourt, de son procédé de préparation, du mutant et de son procédé de sélection, ledit fragment d'ADN manquant soit ne comprend qu'une partie du gène bêta-galactosidase, soit comprend une partie au moins du gène bêta-galactosidase et s'étend au moins en aval de ce gène sur au moins 1,0 kb.

La première de ces formes d'exécution préférées est plus particulièrement destinée à une utilisation dans des pays à climat tempéré, voire relativement froid. La seconde de ces formes d'exécution préférées est plus particulièrement destinée à une utilisation dans des pays à climat relativement chaud.

Ladite première forme d'exécution préférée est également susceptible d'être utilisée dans des pays à climat relativement chaud pour autant qu'on y dispose de moyens de réfrigération adéquats, notamment d'une chaîne du froid. De même, ladite deuxième forme d'exécution préférée est également susceptible d'être utilisée dans des pays à climat relativement froid sans faire usage de moyens de réfrigération particuliers, en se passant notamment d'une chaîne du froid.

Dans le cadre de ladite première forme d'exécution préférée, le mutant de *L.bulgaricus* est apparemment incapable de fermenter seul le lactose, mais, cultivé dans un lait en symbiose avec *S.thermophilus*, il est capable d'acidifier ce lait pratiquement aussi bien que la souche mère dont il est issu. L'addition de faibles quantités de glucose permet de moduler la vitesse de cette acidification et le niveau de postacidification à la conservation.

Dans le cadre de ladite deuxième forme d'exécution préférée, le mutant de *L.bulgaricus* est apparemment incapable de fermenter seul le lactose, et, cultivé dans un lait en symbiose avec *S.thermophilus*, il acidifie ce lait à une vitesse moins grande et jusqu'à un pH moins élevé que la souche mère dont il est issu. L'addition d'une faible quantité de glucose permet d'accélérer un peu la vitesse de cette acidification et d'abaisser légèrement le pH atteint, pratiquement sans poser de problème de postacidification.

Dans le cadre de chacune de ces deux formes d'exécution préférées, il est possible de maintenir un relativement grand nombre de cellules vivantes de chacun des microorganismes dans les yogourts obtenus.

Pour mettre en oeuvre le procédé de préparation d'un yogourt selon la présente invention, on peut utiliser comme matière première un lait animal et/ou végétal, frais ou reconstitué, écrémé, semi-écrémé ou entier, pasteurisé, comprenant 10-20% en poids de matière sèche. On inocule de préférence ce lait avec 0,2-5%, de préférence 0,5-3%, en volume d'une culture contenant 10^6 - 10^{10} , de préférence 10^8 - 10^9 , cellules/ml dudit mutant de *Lactobacillus bulgaricus* et 1-5%, de préférence 2-4%, en volume d'une culture contenant 10^6 - 10^{10} , de préférence 10^8 - 10^9 , cellules/ml de *Streptococcus thermophilus*.

On peut faire fermenter le lait durant 2,5-15 h à 35-48°C. Le pH atteint au cours de cette fermentation ou acidification peut varier entre environ 4,3 et 4,8 dans le cadre de ladite première forme d'exécution, à savoir celle où ledit fragment manquant d'ADN de *L.bulgaricus* ne comprend qu'une partie au moins du gène bêta-galactosidase. Ce pH peut être abaissé de environ 0,1-0,5 unités par addition de environ 0,2-2% en poids de glucose au lait de départ.

Le pH atteint au cours de cette fermentation ou acidification peut varier entre environ 4,5 et 5,0 dans le cadre de ladite deuxième forme d'exécution, à savoir celle où ledit fragment manquant d'ADN de *L.bulgaricus* comprend une partie au moins du gène bêta-galactosidase et s'étend au moins en aval de ce gène sur au moins 1,0 kb. Ce pH peut être abaissé de environ 0,05-0,3 unités par addition de environ 0,2-2% en poids de glucose au lait de départ.

On peut obtenir ainsi un yogourt contenant des nombres respectifs de cellules/ml dudit mutant de *L.bulgaricus* et de *S.thermophilus* comparables aux nombres de cellules/ml présentés par les cultures utilisées pour l'incubation. Les rapports entre ces nombres respectifs sont situés de préférence entre environ 1:20 et 1:7, voire entre 1:20 et 1:4 dans le cadre de ladite première forme d'exécution, et entre environ 1:10 et 1:4, voire entre 1:10 et 1:1 dans le cadre de ladite deuxième forme d'exécution.

Ce yogourt présente donc des qualités organoleptiques présentant le caractère typique du yogourt traditionnel dû à l'utilisation en symbiose de *L.bulgaricus* et *S.thermophilus*. Il peut être conservé durant plusieurs semaines sous réfrigération, voire à température ambiante pour ladite deuxième forme d'exécution, sans que le pH chute de plus de environ 0,05-0,5 unités, sans qu'apparaisse de goût amer, et sans que le nombre de cellules vivantes qu'il contient ne présente de variations notables.

Pour mettre en oeuvre le procédé de sélection d'un mutant de *L.bulgaricus* selon la présente invention,

on choisit de préférence comme souche mère une souche utilisée commercialement et présentant donc toutes les qualités requises pour la production d'un bon yogourt traditionnel du commerce.

5 Avec une telle souche mère, on peut réaliser un criblage sur plaque X-gal tel que décrit par B.Mollet et al., Journal of Bacteriology 172, 5670-5676 (1990) en référence à J.H.Miller (1972), par exemple. On peut isoler ainsi des colonies présentant une mutation bêta-galactosidase moins, autrement dit des mutants incapables de fermenter le lactose du fait d'un disfonctionnement de l'enzyme bêta-galactosidase grâce à laquelle *L.bulgaricus* doit normalement hydrolyser le lactose en glucose et galactose avant de pouvoir consommer le glucose.

10 On peut soumettre ces colonies de mutants à un test de stabilité en les cultivant dans un milieu contenant du lactose comme seule source d'énergie, tel qu'un lait de vache, par exemple, afin d'éliminer les mutants susceptibles de retourner spontanément à l'état original bêta-galactosidase plus.

15 On peut extraire l'ADN chromosomique des mutants stables de la manière décrite par M.Delley et al., Appl. Environ. Microbiol. 56, 1967-70 (1990), par exemple. On peut digérer l'ADN à l'aide d'enzymes de restriction telles que BamHI, EcoRI, HindIII, Sall et TaqI, par exemple.

20 15 On soumet alors l'ADN digéré à un test de détection de fragments compris dans une région comprenant le gène bêta-galactosidase. Pour ce faire, on peut séparer les fragments d'ADN ainsi obtenus sur gel d'agarose, les placer sur une membrane de transfert pour criblage de gènes par hybridation, et réaliser une hybridation avec une sonde ADN portant le gène bêta-galactosidase selon la méthode des taches de Southern (E.Southern, J.Mol.Biol. 98, 503-517, 1975), par exemple. On peut utiliser comme sonde ADN un fragment Sall-BamHI du plasmide pMZ2 (B.Mollet et al., J.Bacteriol.172, 5670-5676, 1990), fragment que l'on peut marquer au ^{32}P , qui présente une longueur de 4,3 kb et qui contient tout le gène bêta-galactosidase, par exemple.

25 Pour réaliser ledit test de détection, on peut également appliquer la méthode de la PCR avec des amorces spécifiques, par exemple (PCR est le sigle de l'expression anglaise "Polymerase Chain Reaction"; cf. Saiki et al., Science 230, 1350-1354, 1985 et Saiki et al., Science 239, 487-491, 1988).

30 On peut sélectionner alors un mutant présentant un ADN dans lequel manque un fragment comprenant une partie au moins du gène bêta-galactosidase. On a constaté en effet que de tels mutants d'une souche mère commerciale pouvaient être utilisés avantageusement en symbiose avec *S.thermophilus* pour la préparation des présents yogourts.

35 30 On a constaté en particulier que de tels mutants présentant un ADN dans lequel manque un fragment ne comprenant qu'une partie du gène bêta-galactosidase, fragment qui peut présenter une longueur comprise entre quelques paires de base et la quasi totalité de la longueur du gène bêta-galactosidase, se prêtent particulièrement bien à la préparation d'un yogourt à longue conservation sous réfrigération dans des pays à climat tempéré, voire relativement froid. Parmi divers mutants sélectionnés de ce type, l'un a été déposé, à titre d'exemple, selon le Traité de Budapest, le 29.03.91., à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 7524 Paris Cedex 15, France, où il a reçu le No CNCM I-1068.

40 Des détails concernant la morphologie et les propriétés de cette souche CNCM I-1068 sont donnés ci-après:

Morphologie:

- Microorganisme Gram positif, catalase négatif et anaérobre facultatif.
- Bacilles droits, sans flagelles, ni formation de spores.

Fermentation des sucres:

- Production d'acide à partir de:
 - D-glucose
 - D-fructose
 - D-mannose

Autres:

- 55 55 - Pas de production d'acide à partir du lactose (pas d'enzyme bêta-galactosidase fonctionnelle).

On a constaté aussi en particulier que de tels mutants présentant un ADN dans lequel manque un fragment comprenant une partie au moins du gène bêta-galactosidase et s'étendant au moins en aval de ce gène sur au moins 1,0 kb, se prêtent particulièrement bien à la préparation d'un yogourt à longue

conservation sous réfrigération dans des pays à climat relativement chaud. Parmi les divers mutants sélectionnés de ce type, l'un a été déposé, à titre d'exemple, selon le Traité de Budapest, le 29.03.91, à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 7524 Paris Cedex 15, France, où il a reçu le No CNCM I-1067.

5 Des détails concernant la morphologie et les propriétés de cette souche CNCM I-1067 sont donnés ci-après:

Morphologie:

- 10 - Microorganisme Gram positif, catalase négatif et anaérobe facultatif.
 - Bacilles droits, sans flagelles, ni formation de spores.

Fermentation des sucres:

- 15 - Production d'acide à partir de:
 - D-glucose
 - D-fructose
 - D-mannose

20 Autres:

- Pas de production d'acide à partir du lactose (pas d'enzyme bêta-galactosidase fonctionnelle).

Les exemples ci-après sont présentés à titre d'illustration des produits et procédés selon la présente invention. Les pourcentages y sont donnés en poids, sauf indication contraire.

25 Exemple 1

On stérilise 5 litres de milieu de culture MRS à 121 °C durant 15 min. On les inocule avec 5% en volume d'une culture active de la souche Lactobacillus bulgaricus CNCM I-1068 contenant environ 10⁹ 30 cellules/ml. On incube à 41 °C durant 8 h et l'on obtient un levain contenant 4,5·10⁸ cellules/ml.

On stérilise à 121 °C durant 15 min 5 litres de lait écrémé reconstitué à 10% de matière sèche auquel on a ajouté 0,1% d'extrait de levure. On les inocule avec 2% d'une culture active de Streptococcus thermophilus épaisissant du commerce contenant environ 10⁹ cellules/ml. On incube à 41 °C durant 4 h et l'on obtient un levain contenant 4,5·10⁸ cellules/ml.

35 On inocule ensuite un lot de lait entier à 3,7% de matière grasse renforcé avec 2,5% de lait écrémé en poudre et pasteurisé 30 min à 90 °C, avec 2% en volume du levain de L.bulgaricus I-1068 et 3% en volume du levain de S.thermophilus épaisissant. On brasse le lait inoculé, on le répartit en pots et on l'incube durant 4 h à 41 °C.

40 On obtient un yogourt qui présente une bonne texture ferme et lisse, ainsi qu'une saveur douce agréable, typique de ce genre de produit. Ce yogourt a un pH de 4,53 et contient 4,6·10⁷ cellules/ml de L.bulgaricus I-1068 et 6,8·10⁸ cellules/ml de S.thermophilus.

On soumet ce yogourt à un test de conservation à 4 °C et à 12 °C. Dans ce test, on mesure le pH et on déguste le produit après 1, 7, 14 et 24 d (jours) de conservation. Les résultats sont présentés dans le tableau 1 ci-après.

45 Exemple 2

On procède de la manière décrite à l'exemple 1, mais on utilise la souche de L.bulgaricus CNCM I-1067 à la place de la souche CNCM I-1068.

50 Le levain de L.bulgaricus obtenu contient 5,2·10⁸ cellules/ml.

On obtient un yogourt présentant un pH de 4,55 après 8h30 d'incubation à 41 °C. Il contient 5,6·10⁷ cellules/ml de L.bulgaricus CNCM I-1067 et 5,5·10⁸ cellules/ml de S.thermophilus. Il présente une bonne texture et une saveur agréable comparables à celles du yogourt obtenu à l'exemple 1.

55 On soumet ce yogourt au test de conservation décrit à l'exemple 1. Les résultats sont présentés dans le tableau 1 ci-après.

Exemple comparatif i)

A titre de comparaison, on procède de la manière décrite à l'exemple 1 en remplaçant les deux mutants I-1067 et I-1068 par leur souche mère qui est une souche utilisée industriellement pour la fabrication de yogourts.

On obtient un yogourt témoin (i) présentant un pH de 4,53 après 3h30 d'incubation à 41 °C. Il contient 5 2,9.10⁷ cellules/ml de L.bulgaricus et 4,9.10⁸ cellules/ml de S.thermophilus. Il présente une bonne texture et une saveur douce agréable.

On soumet ce yogourt témoin (i) au test de conservation décrit à l'exemple 1. Les résultats sont présentés dans le tableau 1 ci-après.

10 Tableau 1

	Ex no (CNCM no)	Temps de stockage	Conservation à 4°C pH dégustation	Conservation à 12°C pH dégustation
20 (d)				
25	1 (I-1068)	1	4,53 bon, doux	4,53 bon, doux
		7	4,41 bon, doux	4,20 bon, aromatique
		14	4,30 bon, aromatique	4,13 bon, aromatique
		24	4,22 bon, aromatique	4,06 bon, aromatique
30	2 (I-1067)	1	4,55 bon, doux	4,55 bon, doux
		7	4,48 bon, doux	4,35 bon, aromatique
		14	4,46 doux, aromatique	4,22 bon, aromatique
35		24	4,42 doux, aromatique	4,20 bon, aromatique
comparatif i) (témoin i)				
40		1	4,53 bon, doux	4,53 bon, doux
		7	4,27 lég.acide	4,18 acide
		14	4,18 lég.amer	3,97 amer
		24	4,16 lég.amer	3,92 très acide, amer

50 Ces résultats montrent que les deux yogourts des exemples 1 et 2 sont très stables à la conservation, leur postacidification étant beaucoup moins rapide que celle du yogourt témoin. La postacidification du yogourt de l'exemple 2 est encore plus faible que celle du yogourt de l'exemple 1. Enfin, contrairement à ce qui se passe avec le yogourt témoin, on ne constate l'apparition d'aucun goût amer, même léger, dans 55 les yogourts des exemples 1 et 2.

Exemples 3-6

On procède de la même manière qu'à l'exemple 1, à l'exception du fait que l'on ajoute 0,5% de glucose dans le lait à l'exemple 3 et 1% de glucose dans le lait à l'exemple 4 avant de le pasteuriser.

De même, on procède comme à l'exemple 2, à l'exception du fait que l'on ajoute 0,5% de glucose dans le lait à l'exemple 5 et 1% de glucose dans le lait à l'exemple 6.

Le lait inoculé est incubé à 41 °C, pendant 3h40 jusqu'à un pH de 4,55 à l'exemple 3, pendant 3h40 jusqu'à un pH de 4,53 à l'exemple 4, et pendant 8 h jusqu'à un pH de 4,63 aux exemples 5 et 6.

Les yogourts ainsi obtenus présentent une bonne texture et une saveur agréable. Leurs teneurs respectives en *L.bulgaricus* et *S.thermophilus*, exprimées en nombre de cellules actives par ml, sont de 4,7.10⁷ (I-1068) et 6,4.10⁸, 7,10⁷ (I-1068) et 9,0.10⁸, 7,8.10⁷ (I-1067) et 7,5.10⁸, ainsi que 7,9.10⁷ (I-1067) et 5,7.10⁸ pour les exemples respectifs 4, 5, 6 et 7.

On soumet tous ces yogourts au test de conservation décrit à l'exemple 1 et l'on obtient les résultats présentés au tableau 2 ci-après:

Tableau 2

Ex no (CNCM no)	Temps de stockage (d)	Conservation à 4 °C		Conservation à 12 °C	
		pH	dégustation	pH	dégustation
3 (I-1068)	1	4,55	bon, doux	4,55	bon, doux
	7	4,36	bon, aromatique	4,07	bon, acide
	14	4,30	bon, aromatique	4,01	bon, acide
	24	4,25	bon, aromatique	3,94	bon, acide
4 (I-1068)	1	4,53	bon, doux	4,53	bon, doux
	7	4,24	bon, aromatique	4,00	bon, acide
	14	4,15	bon, aromatique	3,93	très acide
	24	4,08	bon, aromatique	3,84	très acide
5 (I-1067)	1	4,63	bon, doux	4,63	bon, doux
	7	4,42	bon, aromatique	4,30	aromatique
	14	4,42	bon, aromatique	4,19	aromatique
	24	4,40	bon, aromatique	4,16	aromatique
6 (I-1067)	1	4,63	bon, doux	4,63	bon, doux
	7	4,42	bon, aromatique	4,31	aromatique
	14	4,42	bon, aromatique	4,22	aromatique
	24	4,40	bon, aromatique	4,15	aromatique

Ces résultats montrent que l'on peut moduler le degré de postacidification du yogourt en ajoutant du glucose dans le lait lorsque le mutant de *L.bulgaricus* utilisé est du type dans lequel ledit fragment d'ADN manquant ne comprend qu'une partie du gène bêta-galactosidase (Exemples 3 et 4, *L.bulgaricus* CNCM I-1068). Cette postacidification plus ou moins réduite fait qu'un tel mutant est plus particulièrement destiné à être utilisé pour préparer des yogourts dans des pays à climat tempéré ou relativement froid.

Par contre, on ne modifie qu'à peine le degré de postacidification du yogourt en ajoutant du glucose dans le lait lorsque le mutant de *L.bulgaricus* utilisé est du type dans lequel ledit fragment d'ADN manquant comprend une partie au moins du gène bêta-galactosidase et s'étend au moins en aval de ce gène sur au moins 1,0 kb (Exemples 5 et 6, *L.bulgaricus* CNCM I-1067). Cette absence d'influence du glucose sur la postacidification permet l'utilisation d'un mutant de ce type pour la préparation de yogourts aromatisés sucrés, par exemple. La postacidification elle-même très réduite, même à 12 °C, destine en outre un tel mutant à être plus particulièrement utilisé pour préparer des yogourts dans des pays à climat relativement chaud.

Exemple 7

On prépare deux levains semblables à ceux de l'exemple 2, l'un contenant 4,3.10⁸ cellules/ml de *L.bulgaricus* CNCM I-1067 et l'autre contenant 6.10⁸ cellules/ml de *S.thermophilus* filant.

Dans un lait partiellement écrémé contenant 2,8% de matière grasse renforcé avec 5% de lait écrémé en poudre, et pasteurisé 30 minutes à 90 °C, on inocule 2% en volume du levain de *L.bulgaricus* et 3,5% en volume du levain de *S.thermophilus* épaississant. Après incubation pendant 8 heures à 41 °C, on

refroidit et on brasse le yogourt obtenu, avant de le répartir en pots. On obtient un yogourt de type brassé présentant un pH de 4,62, une bonne texture crémeuse et une saveur agréable, qui contient $6,4 \cdot 10^7$ cellules/ml de *L.bulgaricus* CNCM I-1067 et $4,5 \cdot 10^8$ cellules/ml de *S.thermophilus* filant.

On soumet ce yogourt au test de conservation décrit à l'exemple 1. Les résultats du test sont présentés 5 au tableau 3 ci-après.

Exemple comparatif ii)

On procède de la manière décrite à l'exemple 7, à l'exception du fait que l'on prépare un levain de 10 *L.bulgaricus* non pas avec la souche CNCM I-1067, mais avec l'une des souches présentant une faible activité protéolytique du brevet US 4425366.

On inocule ensuite un même lait et dans les mêmes conditions qu'à l'exemple 7. Après 8h30 d'incubation à 41°C, on obtient également un yogourt de type brassé présentant un pH de 4,63, une 15 texture crémeuse et une saveur agréable, qui contient $1,6 \cdot 10^7$ cellules/ml de *L.bulgaricus* et $2,6 \cdot 10^8$ cellules/ml de *S.thermophilus*.

On soumet ce yogourt témoin au test de conservation décrit à l'exemple 1 et l'on obtient les résultats présentés au tableau 3 ci-après.

20 Tableau 3

	Ex no (CNCM no)	Temps de stockage	Conservation à 4°C		Conservation à 12°C	
			pH	dégustation	pH	dégustation
30		(d)				
	7	1	4,62	bon, doux	4,62	bon, doux
35	(I-1067)	7	4,53	bon, doux	4,46	aromatique
		14	4,48	lég. aromatique	4,29	aromatique
		24	4,47	lég. aromatique	4,24	aromatique
40	comparatif ii)					
	(témoin ii)					
45		1	4,63	doux	4,63	bon, doux
		7	4,54	doux	4,39	bon, doux
		14	4,47	doux	4,25	lég. acide
50		24	4,39	lég. aromatique	4,19	lég. acide

55 Ces résultats montrent que la souche CNCM I-1067 peut avantageusement remplacer l'une des souches de US 4425366 dans la préparation d'un yogourt longue conservation, car, pour une postacidification comparable, elle permet d'obtenir un yogourt plus aromatique qui contient un nombre relatif de cellules de *L.bulgaricus* plus élevé.

Exemples 8 - 11 (sélection)

De la manière décrite plus haut, on met en oeuvre le procédé de sélection d'un mutant de *L.bulgaricus* selon la présente invention à partir de quatre souches mères différentes utilisées commercialement, dont 5 deux présentent des propriétés texturantes, à savoir filantes. On sélectionne ainsi divers mutants présentant un ADN dans lequel manque un fragment ne comprenant qu'une partie du gène bêta-galactosidase.

Parmi ces mutants, quatre, à savoir un pour chaque souche mère différente, ont été déposés à titre d'exemple, selon le Traité de Budapest, le 02.04.92, à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 7524 Paris Cedex 15, France, où ils ont reçu les Nos 10 CNCM I-1191, I-1193, I-1196 et I-1198.

Des détails concernant la morphologie et les propriétés de ces souches sont donnés ci-après :

Morphologie :

- 15 - Microorganismes Gram positifs, catalase négatifs, anaérobies facultatifs.
 - Bacilles droits, sans flagelles, pas de formation de spores.

Fermentation des sucres :

- 20 - Production d'acide à partir de :

	I-1191	I-1193	I-1196	I-1198
D-glucose	+	+	+	+
D-fructose	+	+	+	+
D-mannose	+	+	+	+
Trehalose	+	-	-	-

Autres :

- 30 - Pas de production d'acide à partir du lactose (pas d'enzyme bêta-galactosidase fonctionnelle).
 - Les souches CNCM I-1196 et I-1198 présentent des propriétés texturantes (production de polysaccharides).

Exemples 8 et 9 (préparation de yogourts)

On prépare deux levains contenant chacun environ 10^8 cellules/ml de l'une des souches de *L.bulgaricus* CNCM I-1191 et I-1193, ainsi qu'un levain contenant environ 10^9 cellules/ml d'une culture de 40 *Streptococcus thermophilus* du commerce.

On prépare deux lots de 40 l de lait frais à 3,7% de matière grasse additionné de 1,5% de lait écrémé en poudre et pasteurisé 3 min à 98°C. On inocule chacun des deux lots avec 2% en volume de l'un des deux levains de *L.bulgaricus* CNCM I-1191 et I-1193, et l'on incube à 40°C durant respectivement 9 h et 4 h 15 min.

On obtient des yogourts qui présentent une texture ferme et lisse, une saveur douce et typique, un pH de 4,65 et des teneurs respectives en nombre de cellules de *L.bulgaricus* et de *S.thermophilus* par ml de 4,5.10⁶ (I-1191) et 2,2.10⁸, ainsi que 2,4.10⁷ (I-1193) et 5,5.10⁸.

On soumet ces yogourts au test de conservation décrit à l'exemple 1. Les résultats sont présentés dans le tableau 4 ci-après.

Exemples 10 et 11 (préparation de yogourts)

On prépare deux levains contenant chacun environ 10^8 cellules/ml de l'une des souches de *L.bulgaricus* filantes CNCM I-1196 et I-1198, ainsi qu'un levain contenant environ 10^9 cellules/ml d'une culture de *S.thermophilus* du commerce.

On prépare deux lots de 20 l de lait à 1,5% de matière grasse additionné de 2,5% de lait écrémé en poudre et pasteurisé. On inocule chacun des deux lots avec 2% en volume de l'un des deux levains de *L.bulgaricus* filant CNCM I-1196 et I-1198, et l'on incube 5 h à 40°C.

On obtient des yogourts qui présentent une texture crémeuse, une saveur douce et typique, un pH de 4,65 et des teneurs respectives en nombre de cellules de *L.bulgaricus* et de *S.thermophilus* par ml de $6,0 \cdot 10^6$ (I-1196) et $3,5 \cdot 10^8$, ainsi que $1,8 \cdot 10^7$ (I-1198) et $5,0 \cdot 10^7$.

On soumet ces yogourts au test de conservation décrit à l'exemple 1. Les résultats sont présentés dans 5 le tableau 4 ci-après.

Tableau 4

Ex no (CNCM no)	Temps de stockage (d)	Conservation à 4°C		Conservation à 12°C	
		pH	dégustation	pH	dégustation
8 (I-1191)	1	4,50	bon, doux	4,50	bon, doux
	7	4,39	bon, doux	4,25	bon, aromatique
	14	4,33	bon, aromatique	4,18	bon, aromatique
	24	4,28	bon, aromatique	4,05	bon, aromatique
9 (I-1193)	1	4,44	bon, doux	4,44	bon, doux
	7	4,32	bon, aromatique	4,20	bon, aromatique
	14	4,25	bon, aromatique	4,12	bon, aromatique
	24	4,23	bon, aromatique	4,02	bon, aromatique
10 (I-1196)	1	4,45	bon, doux	4,45	bon, doux
	7	4,43	bon, doux	4,32	bon, aromatique
	14	4,41	bon, doux	4,23	bon, aromatique
	24	4,34	bon, doux	4,23	bon, aromatique
11 (I-1198)	1	4,50	bon, doux	4,50	bon, doux
	7	4,38	bon, doux	4,29	bon, aromatique
	14	4,40	bon, doux	4,24	bon, aromatique
	24	4,35	doux, aromatique	4,20	bon, aromatique

Si l'on compare ces résultats entre eux ainsi qu'avec ceux illustrés au Tableau 1, Ex. no 1, on constate que la postacidification de tous ces yogourts est très semblable et beaucoup moins rapide que celle du yogourt témoin (Tableau 1, Ex. comparatif i). Ceci montre que la mise en oeuvre du procédé de sélection selon la présente invention permet de sélectionner à partir de souches mères différentes, autrement dit à partir de n'importe quelle souche de *L.bulgaricus* du commerce, des mutants, notamment des mutants présentant un ADN dans lequel manque un fragment ne contenant qu'une partie du gène bêta-galactosidase, qui, utilisés en combinaison avec n'importe quelle souche de *S.thermophilus* du commerce permettent de préparer des yogourts de caractère traditionnel présentant pratiquement les mêmes propriétés remarquables de conservation.

Exemples 12 - 15 (sélection)

De la manière décrite plus haut, on met en oeuvre le procédé de sélection d'un mutant de *L.bulgaricus* selon la présente invention à partir de quatre souches mère différentes utilisées commercialement, dont deux présentent des propriétés texturantes, à savoir filantes. On sélectionne ainsi divers mutants présentant un ADN dans lequel manque un fragment comprenant une partie au moins du gène bêta-galactosidase et s'étendant au moins en aval de ce gène sur au moins 1,0 kb.

Parmi ces mutants, quatre, à savoir un pour chaque souche mère différente, ont été déposés à titre d'exemple, selon le Traité de Budapest, le 02.04.92, à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 28 rue du Dr. Roux, 7524 Paris Cedex 15, France, où ils ont reçu les Nos CNCM I-1192, I-1194, I-1195 et I-1197.

Des détails concernant la morphologie et les propriétés de ces souches sont donnés ci-après :

Morphologie :

- Microorganismes Gram positifs, catalase négatifs, anaérobies facultatifs.
- Bacilles droits, sans flagelles, pas de formation de spores.

Fermentation des sucres :

- Production d'acide à partir de :

	I-1192	I-1194	I-1195	I-1197
D-glucose	+	+	+	+
D-fructose	+	+	+	+
D-mannose	+	+	+	+
Trehalose	+	-	-	-

Autres :

- Pas de production d'acide à partir du lactose (pas d'enzyme bêta-galactosidase fonctionnelle).
 - Les souches CNCM I-1195 et I-1197 présentent des propriétés texturantes (production de polysaccharides).

Exemples 12 - 15 (préparation de yogourts)

On prépare quatre levains contenant chacun environ 10^8 cellules/ml de l'une des souches de *L.bulgaricus* CNCM I-1192, I-1194, I-1195 et I-1197, ainsi qu'un levain contenant environ cellules/ml d'une culture de *Streptococcus thermophilus* du commerce.

On prépare quatre lots de 40 l de lait frais à 3,7% de matière grasse additionné de 1,5% de lait écrémé en poudre et pasteurisé 3 min à 98 °C. On inocule chacun des quatre lots avec 2% en volume de l'un des quatre levains de *L.bulgaricus* CNCM I-1192, I-1194, I-1195 et I-1197, et l'on incube 9 h à 40 °C.

On obtient des yogourts qui présentent une texture ferme et lisse (I-1192, I-1194) ou crémeuse (I-1194, I-1195), une flaveur douce à très douce et typique, des pH respectifs de 4,60 (I-1192), 4,80 (I-1194), 4,76 (I-1195) et 4,66 (I-1197), et des teneurs respectives en nombre de cellules de *L.bulgaricus* et de *S.thermophilus* par ml de $9,9 \cdot 10^6$ (I-1192) et $1,1 \cdot 10^8$, $3,5 \cdot 10^6$ (I-1194) et $7,9 \cdot 10^7$, $2,3 \cdot 10^6$ (I-1195) et $9,3 \cdot 10^7$, ainsi que $1,7 \cdot 10^7$ (I-1197) et $1,7 \cdot 10^8$.

On soumet ces yogourts au test de conservation décrit à l'exemple 1. Les résultats sont présentés dans le tableau 5 ci-après.

35

40

45

50

55

Tableau 5

Ex no (CNCM no)	Temps de stockage (d)	Conservation à 4 °C		Conservation à 12 °C	
		pH	dégustation	pH	dégustation
12 (I-1192)	1	4,57	bon, doux	4,57	bon, doux
	7	4,46	bon, doux	4,33	bon, aromatique
	14	4,49	bon, doux	4,33	bon, aromatique
	24	4,40	bon, aromatique	4,26	bon, aromatique
13 (I-1194)	1	4,90	très doux	4,90	très doux
	7	4,77	très doux	4,60	bon, doux
	14	4,74	très doux	4,64	bon, doux
	24	4,66	bon, doux	4,53	bon, doux
14 (I-1195)	1	4,61	bon, doux	4,61	bon, doux
	7	4,57	bon, doux	4,43	bon, doux
	14	4,59	bon, doux	4,34	bon, aromatique
	24	4,49	bon, doux	4,29	bon, aromatique
15 (I-1196)	1	4,52	bon, doux	4,52	bon, doux
	7	4,48	bon, doux	4,34	bon, aromatique
	14	4,41	bon, doux	4,18	bon, aromatique
	24	4,31	doux, aromatique	4,20	bon, aromatique

Si l'on compare ces résultats entre eux ainsi qu'avec ceux illustrés au Tableau 1, Ex. no 2, on constate que la postacidification de tous ces yogourts est très semblable, beaucoup moins rapide que celle du yogourt témoin (Tableau 1, Ex. comparatif i), et même encore plus faible que celle des yogourts des exemples 1,8,9,10 et 11. Ceci montre que la mise en oeuvre du procédé de sélection selon la présente invention permet de sélectionner à partir de souches mère différentes, autrement dit à partir de n'importe quelle souche de *L.bulgaricus* du commerce, des mutants, notamment des mutants présentant un ADN dans lequel manque un fragment contenant une partie au moins du gène bêta-galactosidase et s'étendant au moins en aval de ce gène sur au moins 1,0 kb, qui, utilisés en combinaison avec n'importe quelle souche de *S.thermophilus* du commerce permettent de préparer des yogourts de caractère traditionnel présentant pratiquement les mêmes propriétés remarquables de conservation.

Revendications

1. Yogourt comprenant
 - 10-20% en poids de matière sèche d'un lait animal et/ou végétal,
 - de 10^6 - 10^{10} cellules/ml d'un mutant de *Lactobacillus bulgaricus* dans l'ADN duquel manque un fragment comprenant une partie au moins du gène bêta-galactosidase, et
 - de 10^6 - 10^{10} cellules/ml de *Streptococcus thermophilus*.
2. Yogourt selon la revendication 1, dans lequel ledit fragment d'ADN manquant audit mutant de *L.bulgaricus* ne comprend qu'une partie du gène bêta-galactosidase.
3. Yogourt selon la revendication 1, dans lequel ledit fragment d'ADN manquant audit mutant de *L.bulgaricus* comprend une partie au moins du gène bêta-galactosidase et s'étend au moins en aval de ce gène sur au moins 1,0 kb.
4. Yogourt selon la revendication 1, dans lequel ledit mutant est l'une des souches de *Lactobacillus bulgaricus* CNCM I-1067, I-1068, I-1191, I-1192, I-1193, I-1194, I-1195, I-1196, I-1197 et I-1198.
5. Procédé de préparation d'un yogourt, dans lequel on fait fermenter un lait avec une combinaison d'au moins une souche de *Streptococcus thermophilus* et d'un mutant de *Lactobacillus bulgaricus* dans l'ADN duquel manque un fragment comprenant une partie au moins du gène bêta-galactosidase.
6. Procédé selon la revendication 5, dans lequel on inocule ledit lait avec 0,2-5% en volume d'une culture

contenant 10^6 - 10^{10} cellules/ml dudit mutant de *Lactobacillus bulgaricus* et 1-5% en volume d'une culture contenant 10^6 - 10^{10} cellules/ml de *Streptococcus thermophilus*.

7. Procédé selon la revendication 5, dans lequel on fait fermenter un lait animal et/ou végétal comprenant 10-20% en poids de matière sèche, durant 2,5-15 h à 35-48 °C.
8. Procédé selon la revendication 5, dans lequel ledit mutant de *L.bulgaricus* présente un ADN où manque un fragment ne comprenant qu'une partie du gène bêta-galactosidase.
9. Procédé selon la revendication 5, dans lequel ledit mutant de *L.bulgaricus* présente un ADN où manque un fragment comprenant une partie au moins du gène bêta-galactosidase et s'étendant au moins en aval de ce gène sur au moins 1,0 kb.
10. Procédé selon la revendication 5, dans lequel ledit mutant est l'une des souches de *Lactobacillus bulgaricus* CNCM I-1067, I-1068, I-1191, I-1192, I-1193, I-1194, I-1195, I-1196, I-1197 et I-1198.
11. Mutant de *Lactobacillus bulgaricus*, présentant un ADN où manque un fragment comprenant une partie au moins du gène bêta-galactosidase.
12. Mutant selon la revendication 11, dans lequel ledit fragment d'ADN manquant ne comprend qu'une partie du gène bêta-galactosidase.
13. Mutant selon la revendication 11, dans lequel ledit fragment d'ADN manquant comprend une partie au moins du gène bêta-galactosidase et s'étend au moins en aval de ce gène sur au moins 1,0 kb.
14. Mutant selon la revendication 11 choisi parmi les souches de *Lactobacillus bulgaricus* CNCM I-1067, I-1068, I-1191, I-1192, I-1193, I-1194, I-1195, I-1196, I-1197 et I-1198.
15. Procédé de sélection d'un mutant de *Lactobacillus bulgaricus*, dans lequel:
 - on réalise un criblage d'une souche mère de *L.bulgaricus* sur plaque X-gal pour isoler des colonies présentant une mutation bêta-galactosidase moins,
 - on soumet ces colonies de mutants à un test de stabilité dans un milieu contenant du lactose comme seule source d'énergie,
 - on digère l'ADN chomosomique de mutants stables à l'aide d'enzymes de restriction et on le soumet à un test de détection de fragments compris dans une région comprenant le gène bêta-galactosidase, et
 - l'on sélectionne un mutant présentant un ADN dans lequel manque un fragment comprenant une partie au moins du gène bêta-galactosidase.
16. Procédé selon la revendication 15, dans lequel on sélectionne un mutant présentant un ADN dont ledit fragment manquant ne comprend qu'une partie du gène bêta-galactosidase.
17. Procédé selon la revendication 15, dans lequel on sélectionne un mutant présentant un ADN dont ledit fragment manquant comprend une partie au moins du gène bêta-galactosidase et s'étend au moins en aval de ce gène sur au moins 1,0 kb.

50

55



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande

EP 92 10 8573
PAGE1

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
D,X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 14, no. 220 (C-717)(4163) 10 Mai 1990 & JP-A-2 053 437 (SNOW BRAND MILK PROD. CO. LTD.) 22 Février 1990 * abrégé *	1-3,5, 11-13	A23C9/123 C12N1/20 C12N15/01
D,Y	---	6-9	
Y	EP-A-0 081 705 (SOCIETE DES PRODUITS NESTLE) * revendications 1-8 *	6-9	
D	& US-A-4 425 366 ---		
Y	MILCHWISSENSCHAFT vol. 43, no. 10, 1988, MÜNCHEN (WESTD) pages 626 - 631; M.J. AMOROSO ET AL.: 'Glucose, galactose, fructose, lactose and sucrose utilization by lactobacillus bulgaricus and streptococcus thermophilus isolated from commercial yoghurt' *introduction*	6-9	
D,X	WO-A-9 005 459 (GENENCOR INC.) * page 2, ligne 3 - page 3, ligne 23; revendications 1-29 *	11-13	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
D,A	---	1	A23C C12N
D,A	US-A-4 734 361 (KANEHISA MURAO ET AL.) * colonne 2, ligne 60 - colonne 5, ligne 30 *	1,5	
D,X	JOURNAL OF BACTERIOLOGY vol. 172, no. 10, Octobre 1990, pages 5670 - 5676; BEAT MOLLET ET AL.: 'Spontaneous deletion formation within the beta-galactosidase gene of lactobacillus bulgaricus' * le document en entier *	11-17	
	---	-/-	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur	
BERLIN	03 SEPTEMBRE 1992	ALVAREZ ALVAREZ C.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul	T : théorie ou principe à la base de l'invention		
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie	E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date		
A : arrière-plan technologique	D : cité dans la demande		
: divulgation non-écrite	L : cité pour d'autres raisons		
P : document intercalaire	G : membre de la même famille, document correspondant		



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande

EP 92 10 8573
PAGE2

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. CL.5)
D,A	JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY vol. 98, 1975, pages 503 - 517; E.M. SOUTHERN: 'Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis' * le document en entier * -----	15	
DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL.5)			
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur	
BERLIN	03 SEPTEMBRE 1992	ALVAREZ ALVAREZ C.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul	T : théorie ou principe à la base de l'invention		
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie	E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date		
A : arrière-plan technologique	D : cité dans la demande		
O : divulgation non-écrite	L : cité pour d'autres raisons		
P : document intercalaire	& : membre de la même famille, document correspondant		